پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۱ شمارۀ۲، نیمۀ دوّم ۱۳۹۹
صفحۀ ۹۴-۷۶، نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 2, 2020, p. 76-94 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v11i2.76131

بررسی تأثیر محلول‌پاشی اپی‌براسینولید بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نیترات ردوکتاز و رنگدانه‌های فتوسنتزی لوبیا تحت تنش خشکی

مهسا محمدی[1*]، مجید پوریوسف[2]، افشین توکلی[2] و احسان محسنی فرد[3]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(به‌ترتیب pouryousef@znu.ac.ir و tavakoli@znu.ac.ir)
۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران؛ mohsenifard.ehsan@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۲

چکیده

به‌منظور بررسی واکنش برخی پارامترهای فیزیولوژیکی لوبیا و امکان افزایش عملکرد دانه این گیاه با کاربرد اپی‌براسینولید تحت تنش خشکی، پژوهشی به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ اجرا شد. در این پژوهش، شرایط آبیاری در دو سطح شامل آبیاری مطلوب و اعمال تنش خشکی به عنوان عامل اصلی و دو ژنوتیپ لوبیا شامل رقم کوشا و ژنوتیپ COS16 و چهار غلظت براسینواستروئید شامل عدم مصرف (شاهد)، دو، چهار و شش میکرومولار به صورت فاکتوریل در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. در مرحله گلدهی، تنش خشکی اعمال شد و همزمان با اعمال تنش خشکی، بوته‌های لوبیا با براسینواستروئید (اپی‌براسینولید) محلول‌پاشی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت تنش خشکی به طور معنی‌داری در مقایسه با شرایط آبیاری مطلوب افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که اعمال تنش خشکی به ترتیب باعث افزایش ۳۸/۸۹، ۸۴/۰۹، ۴۰/۴۶ و ۲۷/۳۷ درصد در فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز نسبت به آبیاری مطلوب شد. همچنین بالاترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز با کاربرد غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید در شرایط اعمال تنش خشکی حاصل شد. کاربرد اپی‌براسینولید با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها باعث افزایش عملکرد دانه ژنوتیپ‌های لوبیا در هر دو شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی شد. بالاترین عملکرد دانه با کاربرد غلظت ۲ میکرومولار اپی‌براسینولید با میانگین ۲۰۶۸/۲ کیلوگرم بر هکتار به‌دست آمد. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نیز رقم کوشا در شرایط آبیاری مطلوب با میانگین ۳۰۲۵/۴۵ کیلوگرم بر هکتار بیشترین عملکرد دانه و ژنوتیپ COS16 در شرایط تنش خشکی با میانگین ۹۸۰/۸۹ کیلوگرم بر هکتار کمترین عملکرد دانه را نشان دادند. بنابراین کاربرد اپی‌براسینولید را به‌عنوان راهکاری جهت افزایش مقاومت به تنش خشکی و افزایش عملکرد دانه لوبیا در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی می‌توان پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسمیوتاز، عملکرد دانه، کاروتنوئید، محتوای کلروفیل

مقدمه

گیاهان دامنه وسیعی از شرایط نامساعد محیطی به خصوص خشکی، شوری و کاهش یا افزایش دما را در طی دوران زندگیشان تحمل می‌کنند و تعدادی از پاسخ‌ها که شامل سازگاری متابولیکی برای مقابله با این شرایط است را ارائه می‌دهند (Hasanuzzaman *et al.*, 2012; Kosova *et al.*, 2013). خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی و از رایج‌ترین عوامل کاهش‌دهنده رشد گیاهان و تولید عملکرد آن‌ها می‌باشد و به طور معمول همراه با دیگر تنش‌های محیطی از جمله شوری و گرما بهره‌وری گیاهان را کاهش می‌دهد (Abedi & Pakniyat, 2010).

یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مانند خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مکانیسم‌های دفاعی برطرف‌کننده این رادیکال‌هاست که به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و سایر اجزای سلولی منجر می‌گردد (Mittler, 2002). گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های آزاد مانند

*نویسنده مسئول: mohammadi.mahsa@znu.ac.ir

رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، رادیکال پرهیدروکسی ($HO_2^{\cdot}$) و رادیکال آلوکسی ($RO^{\cdot}$) و عوامل غیررادیکالی یا مولکولی مانند هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و اکسیژن منفرد (O_2) می‌باشند (Singh-Gill & Tuteja, 2010).

در شرایط نامطلوب محیطی، نقش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان جهت حفاظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو به غشاء سلولی و سایر اندامک‌های گیاهی در حال رشد بسیار مهم به نظر می‌رسد (AL-Ghamdi, 2009). گیاهان در مقابله با تنش اکسیداتیو از دو روش آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده می‌کنند (Gupta *et al*., 2005). سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیدی در مبارزه با گونه‌های فعال اکسیژن به‌شمار می‌روند و مهم‌ترین ترکیبات سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن، آسکوربیک اسید، آلفاتوکوفرول، گلوتاتیون، زازانتین و آنترازانتین می‌باشند (Xu *et al*., 2008; Abedi & Pakniyat, 2010). گزارش شده است که تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی، با افزایش محتوای آنتی اکسیدان‌ها همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد (Malik *et al*., 2010). بدین ترتیب، آگاهی از تغییرات پروتئین‌ها و آنزیم‌ها تحت شرایط تنش خشکی ممکن است برای شناسایی صفات فیزیولوژیکی مؤثر در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام متحمل مفید باشد.

براسینواستروئیدها (BRs) گروهی از پلی‌هیدروکسی استروئیدهای گیاهی‌اند که در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی و عکس‌العمل‌های مورفولوژیکی نظیر طویل‌شدن ساقه و ریشه، پیچش و اپیناستی برگ‌ها، القای بیوسنتز اتیلن، فعال‌سازی پمپ‌های پروتونی، سنتز نوکلئیک اسید و پروتئین‌ها، تنظیم اسیمیلاسیون و تخصیص کربن، فعال‌سازی فتوسنتز، فتومورفوژنز، تمایز بافت‌های آوندی، آغازش گل‌ها و نمو گل‌ها و میوه‌ها مشارکت می‌نمایند (Talaat & Shawky, 2012). به علاوه، براسینواستروئیدها می‌توانند از طریق فعال نمودن مکانیسم‌های مختلف در گیاهان و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسمیوتاز، پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز، در مقابل صدمات ناشی از تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و دمای بالا محافظت کنند (Ali *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2008). براسینواستروئیدها می‌توانند از برخی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند H_2O_2 به عنوان واسطه‌ای برای القای نسخه‌برداری از ژن‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده کنند (Kang & Guo, 2011). تأثیر براسینواستروئیدها بر افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های گیاهی و فعال‌شدن مقاومت گیاه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از شرایط محیطی مانند تنش‌های خشکی، شوری، فلزات سنگین و دماهای بالا و پایین در برخی از گیاهان گزارش شده است (Bajguz & Hayat, 2009; Ding *et al*., 2012; Li *et al*., 2012).

در برخی مطالعات مشخص شده است که براسینواستروئیدها مقاومت گیاه در برابر تنش و آسیب‌های گیاهی را افزایش می‌دهند و موجب افزایش سازگاری گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌شوند. برای مثال، با بررسی کاربرد خارجی اپی‌براسینولید و هموبراسینولید با غلظت‌های یک و پنج میکرومولار قبل از اعمال تنش خشکی و در مرحله گل‌دهی در لوبیا مشخص شد که کاربرد این هورمون‌ها باعث بهبود اثرات منفی تنش در ریشه‌ها گردید و به‌طور کلی محققان دریافتند که هم در گیاهان تنش‌دیده و هم در گیاهان با آبیاری مطلوب با کاربرد پنج میکرومولار براسینواستروئید عملکرد غلاف لوبیا افزایش یافت (Upreti & Murti, 2004). در مطالعه دیگری با کاربرد براسینولید بر سویا گزارش شد که کاربرد براسینولید باعث به‌حداقل‌رساندن کاهش عملکرد ناشی از تنش خشکی می‌شود. بنابراین می‌توان از این هورمون جهت افزایش مقاومت به تنش خشکی استفاده نمود (Zhang *et al*., 2008). مطالعات نشان داده است که کاربرد خارجی براسینولید با تأثیر بر محتوای پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز، تولید اتیلن، ذخیره پلی‌آمین‌ها و محتوای نسبی آب، باعث افزایش تحمل گیاه به خشکی می‌شود (Behnamnia *et al*., 2009; Yuan *et al*., 2010; Anjum *et al*., 2011; Talaat & Shawky, 2016).

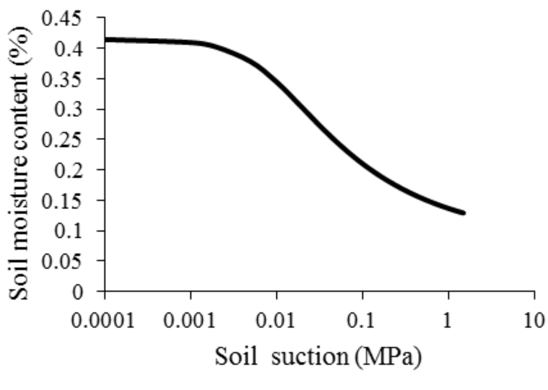
در سال‌های اخیر، به علت تغییرات در شرایط آب و هوایی و نیز افزایش سطح دی‌اکسیدکربن اتمسفری، تنش خشکی بسیار شدیدتر شده است. به این ترتیب، بررسی مکانیسم‌هایی که گیاهان را قادر می‌سازد تا با تنش خشکی سازش پیدا کنند و رشدشان را تحت آن شرایط حفظ نمایند، می‌تواند در انتخاب گیاهان مقاوم به تنش برای کشت در مناطق خشک و نیمه خشک کمک کند. هدف از این پژوهش بررسی امکان افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نیترات ردوکتاز، رنگدانه‌های فتوسنتزی و در نهایت عملکرد دانه لوبیا تحت تنش خشکی با کاربرد اپی‌براسینولید بود.

مواد و روش‌ها

این پـژوهش در سـال زراعـی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ در مزرعـه تحقیقاتی دانشکده کشـاورزی دانشـگاه زنجـان واقـع در عـرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه شمالی و طول جغرافیـایی ۴۸ درجه و ۲۴ دقیقه غربی و ارتفاع ۱۵۹۴ متر از سطح دریـا اجـرا شد. آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طـرح بلـوک های کامل تصادفی در سه تکـرار اجـرا شـد کـه در آن شـرایط آبیاری (در دو سطح آبیاری مطلوب و اعمال تـنش خشـکی) در کرت‌های اصلی قرار گرفت و ژنوتیپ‌های لوبیا (در دو سطح رقم کوشا با تیپ رشد ایستاده و رشد نامحـدود و ژنوتیـپ COS16 با تیپ رشد ایسـتاده و رشـد محـدود) و غلظـت‌هـای مختلـف براسینواستروئید (در چهار سـطح ۰، ۲، ۴ و ۶ میکرومـولار) بـه صورت فاکتوریل در کرت‌های فرعی قرار گرفتند.

به‌منظور آماده‌سازی زمـین، در پـاییز سـال ۱۳۹۴ شـخم عمیق زده شده و در فصل بهار جهت یکنواخـت‌شـدن وضـعیت خاک مزرعه از دیسک و ماله استفاده شد. کشت در اردیبهشـت ماه سال ۱۳۹۵ انجام شد. هر کرت شامل چهار ردیف بـه طـول سه متر بود. کاشت به صورت مسطح، فاصله ردیف‌هـای کاشـت ۵۰ سانتی‌متر، فاصله بوته‌ها بـر روی ردیـف پـنج سـانتی‌متـر و تراکم ۴۰ بوته در مترمربع در نظر گرفته شـد. سیسـتم آبیـاری به‌صورت قطره‌ای بود و اولین آبیـاری بلافاصـله پـس از کاشـت انجام شد و آبیاری‌های بعدی تا زمان اعمال تیمارها بـر اسـاس شرایط محیطی هفته‌ای یک‌بار صورت گرفت. در مراحل مختلف رشد گیاه، علف‌های‌هرز از طریق وجین دستی کنترل شدند. در طول دوره رشد گیاه، آفت یا بیماری که جهت کنتـرل آن نیـاز به سمپاشی باشد، مشاهده نگردید. در مرحلـه گلـدهی (بـه‌گـل رفتن ۵۰ درصد واحدهای آزمایشی)، به‌طور همزمان بـرای هـر دو ژنوتیپ، تنش خشکی اعمال شد و همزمان بـا اعمـال تـنش خشکی، بوته‌های لوبیا با براسینواستروئید (اپـی‌براسـینولید) بـا غلظت‌های ذکرشده محلول‌پاشی شد. جهت اطمینـان از جـذب کافی هورمون توسط گیاه عمل محلول‌پاشی سه بار و بـه‌فاصـله هر چهار روز یکبار بر روی کل بوته انجام گردید.

برای اعمال تنش خشکی، در مرحله گلدهی آبیاری حذف شد و تا رسیدن پتانسیل آب خاک بـه ۱/۵- مگاپاسـکال ادامـه یافت (Contour-Ansel *et al*., 2010) و سپس آبیاری مجدد انجام شد. بـرای تعیـین درصـدی از رطوبـت خـاک کـه در آن پتانسیل آب خاک بـه ۱/۵- مگاپاسـکال مـی‌رسـید از منحنـی رطوبتی خاک استفاده شد (شـکل ۱). بـه ایـن منظـور، بعـد از حذف آبیاری هر دو روز یکبـار نمونـه‌بـرداری از خـاک صـورت گرفت و درصد رطوبت وزنی خاک تعیین شـد و آبیـاری تیمـار تنش وقتی صورت گرفت که درصد رطوبت خاک به ۱۲ درصـد (نقطه پژمردگی دائـم) رسـید. بـرای ترسـیم منحنـی رطـوبتی خاک، نمونـه‌بـرداری صـورت گرفـت و پتانسـیل آب خـاک در رطوبـت‌هـای مختلـف در آزمایشـگاه خاکشناسـی دانشـکده کشاورزی دانشگاه زنجان تعیین شد. سپس منحنی رطوبتی که ارتباط بین درصد رطوبت وزنی و مکش خاک را نشـان مـی‌داد، ترسیم شد (شکل ۱). همچنـین، تیمـار شـاهد نیـز بـر اسـاس شرایط محیطی هر هفته یکبار آبیاری شد.



شکل ۱- منحنی رطوبتی خاک محل انجام پژوهش

Fig. 1. Soil moisture curve of the place of research

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، گایـاکول پراکســـیداز (POD)، آســـکوربات پراکســـیداز (APX) و سوپراکسـید دیسـمیوتاز (SOD) در زمـان اوج تـنش خشـکی (زمانی که تمامی مراحل هورمون‌پاشی صورت گرفته و پتانسیل آب خاک به ۱/۵- مگاپاسکال رسـیده بـود) انـدازه‌گیـری شـد. جهـت اسـتخراج آنـزیم‌هـای کاتـالاز، گایـاکول پراکسـیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز برگ‌های تـازه در ۵۰ میلـی‌مـولار بـافر فسفات (pH = ۷) حـاوی ۱ درصـد (جـرم/حجم) پلـی وینیـل

پیرولیدون (PVP) همگن شده و سپس در g×۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. جهت استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۲ میلی‌مولار آسکوربات نیز به بافر همگن شده‌ی بالا اضافه شد. سپس مایع رویی برای سنجش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفت.

محلول واکنش کاتالاز شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH = ۷)، ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید و عصاره‌ی آنزیم بود. واکنش با افزودن محلول رویی از عصاره‌ی آنزیم آغاز شده و فعالیت این آنزیم بر اساس کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر (ناشی از تجزیه هیدروژن پراکسید) به مدت ۶۰ ثانیه توسط اسپکتروفتومتر (PerkinElmer Lambda 25) قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومولار H_2O_2 در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محلول و ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۳۹/۴ گزارش شد (Chance & Maehly, 1955).

محلول واکنش گایاکول پراکسیداز شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH = ۷)، ۰/۲۵ درصد (حجم/حجم) گایاکول، ۰/۷۵ درصد (حجم/حجم) هیدروژن پراکسید و عصاره آنزیم بود. واکنش با افزودن هیدروژن پراکسید آغاز شده و فعالیت این آنزیم در طول موج ۴۷۰ نانومتر بر اساس توانایی آن برای تبدیل گایاکول به تتراگایاکول به صورت افزایش در جذب به مدت ۲ دقیقه توسط اسپکتروفوتنتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محلول با ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ محاسبه شد (Chance & Maehly, 1955).

محلول واکنش سوپراکسید دیسمیوتاز شامل ۵۰میلی‌مولار بافر فسفات (pH = ۷/۸)، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۷۵ میلی‌مولار نیتروبول تترازولیوم کلراید (NBT)، ۳۰۰ میکرومولار EDTA، ۲ میلی‌مولار ریبوفلاوین و صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیم بود. با قراردادن نمونه‌ها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰ W) بلافاصله واکنش آغاز گردید و پس از ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسمیوتاز، مقدار آنزیمی است که موجب مهار تبدیل ۵۰ درصد NBT به فورمازان می‌گردد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار میلی‌گرم پروتئین محلول بیان گردید (Beauchamp & Fridovich, 1971).

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با مشاهده کاهش ناشی از اکسیدشدن آسکوربیک اسید توسط هیدروژن پراکسید مورد سنجش قرار گرفت. محلول واکنش آسکوربات پراکسیداز شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH = ۷)، ۱ میلی‌مولار آسکوربات، ۱ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید و عصاره آنزیم بود. واکنش با افزودن هیدروژن پراکسید آغاز شده و فعالیت این آنزیم به صورت کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳۰ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محلول با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸ محاسبه گردید (Nakano & Asada, 1981).

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نیز در زمان اوج تنش خشکی اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۰/۲ گرم از نمونه برگی در ۲میلی‌لیتر بافر A (حاوی ۵۰ میلی‌مولار Hepes-KOH (۷/۵ = pH)، ۵ درصد (حجم/حجم) گلیسرول، ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱ میلی‌مولار دیتیوترتول (DTT)، ۱ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلورید (PMSF)، ۱ میلی‌مولار بنزآمیدین و ۱۰ میکرومولار FAD) همگن شده و سپس در g×۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۱ میلی‌لیتر بافر B (حاوی ۵۰ میلی‌مولار Hepes-KOH (pH = ۷/۵)، ۱۰ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱ میلی‌مولار دیتیوترتول (DTT)، ۲ میلی‌مولار پتاسیم نیترات (KNO_3) و ۲۰۰ میکرومولار NADH) اضافه شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. واکنش با افزودن ۲۰۰میکرولیتر روی استات ۰/۵ مولار، ۶۰۰ میکرولیتر سولفانیل آمید ۱ درصد (جرم/حجم) و ۶۰۰ میکرولیتر نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۰۲ درصد (جرم/حجم) خاتمه یافت. محتوای نیتریت در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب میکرومول نیتریت در ساعت به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محلول محاسبه گردید (Mackintosh et al., 1995).

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره‌های استخراج شده، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به ۲۹۵۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه شده و کاملاً به هم زده شد و پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای تعیین غلظت پروتئین از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها نیز در زمان اوج تنش خشکی با کمک روابط زیر محاسبه گردید (Arnon, 1949). اندازه‌گیری این صفات در جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه یافته صورت گرفت.

رابطه۱: (W×۱۰۰۰)/V × ((جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر) ۲/۷۹ - (جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر) ۱۲/۲۵) = کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)

رابطه۲: (W×۱۰۰۰)/V × ((جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر) ۵/۱ - (جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر) ۲۱/۵) = کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)

رابطه۳: (W×۱۰۰۰)/V × ((جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر) ۷/۱۵ + (جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر) ۱۸/۷۱) = کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)

رابطه۴: (W×۱۰۰۰)/V × ۱۹۸/((محتوای کلروفیل b) ۸۵/۰۲ - (محتوای کلروفیل a) ۱/۸۲ - (جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر) ۱۰۰۰)) = کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)

در روابط فوق V حجم نهایی نمونه استخراج‌شده (میلی لیتر) و W وزن تر نمونه (گرم) است.

برای اندازه‌گیری عملکرد دانه، در پایان فصل رشد و پس از رسیدگی کامل مزرعه، مساحت دو مترمربع از سطح مزرعه برداشت شده و عملکرد دانه اندازه‌گیری شد.

پس از انجام اندازه‌گیری‌ها و محاسبات لازم، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد و جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel (2013) استفاده گردید.

نتایج و بحث

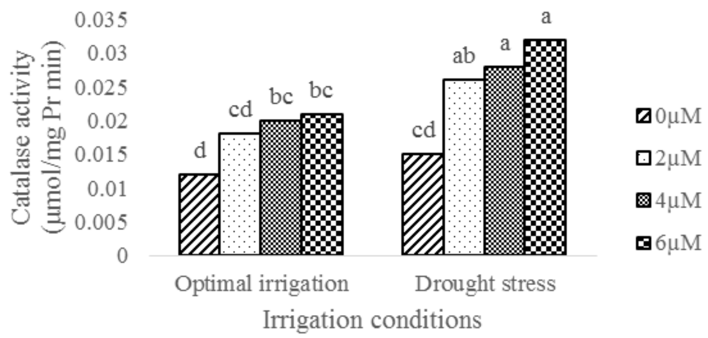
فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

اثر شرایط آبیاری ($p\leq0.01$) و هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) بر فعالیت آنزیم کاتالاز، اثر شرایط آبیاری ($p\leq0.05$)، ژنوتیپ‌ها ($p\leq0.01$) و هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز، اثر شرایط آبیاری ($p\leq0.05$) و هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و اثر شرایط آبیاری ($p\leq0.05$) و هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار بود (جدول ۱). فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی به طور معنی‌داری در مقایسه با شرایط آبیاری مطلوب افزایش پیدا کرد، به‌طوری که اعمال تنش خشکی باعث افزایش ۳۸/۸۹ درصدی در فعالیت کاتالاز، افزایش ۸۴/۰۹ درصدی در فعالیت گایاکول پراکسیداز، افزایش ۴۰/۴۶ درصدی در فعالیت آسکوربات پراکسیداز و افزایش ۲۷/۳۷ درصدی در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نسبت به آبیاری مطلوب شد (جدول ۲).

سوپراکسید دیسموتاز یک آنتی‌اکسیدان قوی است که اولین ماده تولیدشده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن، یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد و تبدیل به اکسیژن و هیدروژن پراکسید می‌کند و در نتیجه باعث پایداری غشای سلول‌های گیاهی در خشکی می‌شود، بنابراین سوپراکسید دیسموتاز به عنوان دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته می‌شود (Nazari *et al*., 2012; Sharma *et a*l., 2012). هیدروژن پراکسید حاصل در مرحله‌ی بعدی توسط آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز پاکسازی می‌شود (Zeid & Shedeed, 2006). کاتالاز، مستقیماً سبب تجزیه هیدروژن پراکسید شده و با تبدیل آن به آب و اکسیژن، سلول‌ها را از اثرات هیدروژن پراکسید محافظت می‌کند (Yong *et al*., 2008; Gaber, 2010). تنش خشکی در این مطالعه موجب افزایش فعالیت کاتالاز شد که این افزایش، نشان‌دهنده مهار کارآمد هیدروژن پراکسید می‌باشد. گزارش شده است که کاتالاز با زدودن گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از تخریب غشاء سلولی به بقاء گیاه کمک می‌کند (Jiang & Zhang, 2001). پراکسیداز به عنوان آنزیم تنش شناخته شده است و با استفاده از ترکیبات فنولیک دهنده الکترون، سبب تجزیه هیدروژن پراکسید می‌گردد (Gaber, 2010) و نیز نقش کلیدی در حذف مالون دی آلدهید دارد که باعث پراکسیداسیون غشاء می‌شود و حفظ ثبات و پایداری دیواره سلولی ایفا می‌کند (Hojati *et al*., 2011). پراکسیداز در سنتز لیگنین و دیگر پلیمرهای فنولیکی نیز دخالت دارد و افزایش در فعالیت این آنزیم می‌تواند از سلول‌ها در برابر غلظت‌های مضر هیدروژن پراکسید محافظت کند (Verma *et al*., 2012). آسکوربات پراکسیداز نیز نقش کلیدی در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن و حفاظت سلول‌ها در مقابل اثرهای مخرب آن در گیاهان دارد (Mishra & Jha, 2011). این آنزیم، یک آنزیم کلیدی در سامانه مهار آنزیمی ROS است که می‌تواند هیدروژن پراکسید تولیدشده در کلروپلاست‌ها را از بین ببرد (Yong *et al*., 2008). در حقیقت آسکوربات پراکسیداز با قدرت چسبندگی زیادی که با هیدروژن پراکسید دارد، می‌تواند در رفع مسمومیت به گیاه کمک کند، در حالی که دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند سرعت این واکنش را بالا ببرند، اما قدرت چسبندگی کمی با هیدروژن پراکسید دارند و نمی‌توانند به خوبی آن را مهار کنند. پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم APX به شدت به بیان ژن APX وابسته است و می‌تواند بعد از تیمار با عوامل تنش‌زا از قبیل خشکی (Koussevitzky *et al*., 2008) و شوری (Wang *et al*., 2009; Liu *et al*., 2013)

افزایش یابد. تحقیقات نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (Mittler, 2002). به طور کلی، گیاهان برای مقابله با خشکی و از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و مبارزه با تنش اکسیداتیو ایجادشده، سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را افزایش می‌دهند. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز با اعمال تنش خشکی توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (Zeid & Shedeed, 2006; Amjad *et al*., 2011; Ahmadizadeh *et al*., 2011; Habibi, 2013) که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. فعالیت گایاکول پراکسیداز در ژنوتیپ COS16 نسبت به رقم کوشا بالاتر بود که نشان دهنده ظرفیت بالاتر این ژنوتیپ برای به دام انداختن گونه‌های فعال اکسیژن است و بنابراین، آسیب به لیپیدهای غشای پلاسمایی در این ژنوتیپ کمتر می‌باشد (جدول ۲). نتایج حاصل از مطالعه ارقام مقاوم و حساس برنج به تنش شوری نیز نشان داده است که تحت تنش شوری سطح فعالیت پراکسیداز در رقم مقاوم به شوری نسبت به رقم حساس به شوری به میزان بیشتری افزایش نشان می‌دهد (Khan & Panda, 2008). آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز در بین دو ژنوتیپ مورد مطالعه، از فعالیت یکسانی برخوردار بود و اختلاف معنی‌داری در مورد فعالیت این آنزیم‌ها بین دو ژنوتیپ وجود نداشت (جداول ۱ و ۲). به عبارت دیگر با توجه به نوع فعالیت این آنزیم‌ها نمی‌توان ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر تفکیک نموده و هیچ یک از ژنوتیپ‌ها را نسبت به دیگری از نظر میزان فعالیت این آنزیم‌ها برتری داد.

کاربرد اپی‌براسینولید باعث افزایش فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز نسبت به عدم کاربرد این هورمون شد (جدول ۲). بالاترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسمیوتاز با کاربرد غلظت ۶ میکرومولار اپی‌براسینولید حاصل شد که با کاربرد سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). کاربرد غلظت ۶ میکرومولار اپی‌براسینولید، باعث افزایش ۸۵/۷۱ درصدی در فعالیت کاتالاز و ۶۴/۳۶ درصدی در فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (جدول ۲). بالاترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با کاربرد غلظت ۴ میکرومولار اپی‌براسینولید حاصل شد که با کاربرد سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). کاربرد غلظت ۴ میکرومولار اپی‌براسینولید، باعث افزایش ۵۴/۳۵ درصدی در فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (جدول ۲). همچنین، بالاترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز با کاربرد غلظت ۴ میکرومولار اپی براسینولید حاصل شد، به‌طوری‌که کاربرد این غلظت، باعث افزایش ۵۵/۲۸ درصدی در فعالیت آسکوربات پراکسیداز نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (جدول ۲). مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن، نتایج مقایسات میانگین اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی نشان داد که بالاترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز با کاربرد غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید در شرایط اعمال تنش خشکی حاصل شد (شکل‌های ۲ تا ۵). کاربرد غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میکرومولار اپی‌براسینولید در شرایط اعمال تنش خشکی، باعث افزایش ۷۳/۳۳، ۸۶/۶۷ و ۱۱۳/۳۳ درصد در فعالیت کاتالاز، افزایش ۵۶/۳۶، ۷۱/۸۲ و ۶۲/۷۳ درصد در فعالیت گایاکول پراکسیداز، افزایش ۱۲/۸۲، ۴۶/۱۵ و ۱۳/۴۶ درصد در فعالیت آسکوربات پراکسیداز و افزایش ۲۹/۱۵، ۴۱/۴۹ و ۴۷/۱۱ درصد در فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (شکل‌های ۲ تا ۵). کاربرد براسینواستروئیدها به طور قابل توجهی مقاومت به خشکی گیاه را بهبود می‌بخشند و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاهش می‌دهند (Talaat *et al*., 2015). اثر براسینواستروئیدها بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است به علت اثر آن‌ها بر رونویسی و یا ترجمه ژن‌ها باشد (Khripach *et al*., 1999; Bajguz, 2000). گزارش شده است که براسینواستروئیدها از طریق تأثیر بر بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، متابولیسم ترکیبات فنولیک و سیستم دفاعی گیاهان را تنظیم می‌کنند (Bajguz & Hayat, 2009; Ahammed *et al*., 2013). افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز پس از کاربرد براسینواستروئید در ذرت (Bhardwaj *et al*., 2007)، گوجه‌فرنگی (Behnamnia *et al*., 2009; Yuan *et al*., 2010)، خردل (Sharma *et al*., 2007; Fariduddin *et al*., 2009; Sirhindi *et al*., 2009; Arora *et al*., 2010)، سویا (Zhang *et al*., 2008) و جو (Kartal *et al*., 2009) نیز گزارش شده است که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد.

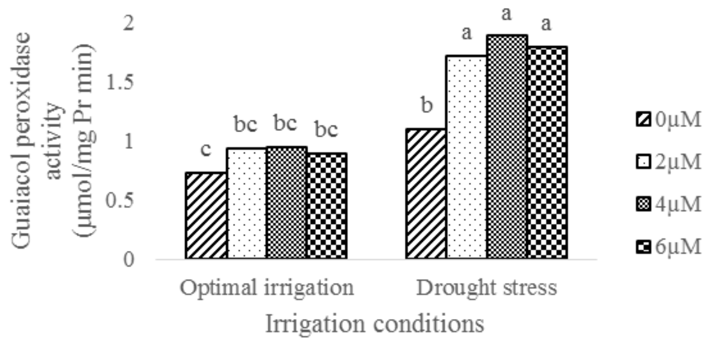


شکل ۲- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر فعالیت کاتالاز

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 2. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the catalase activity

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

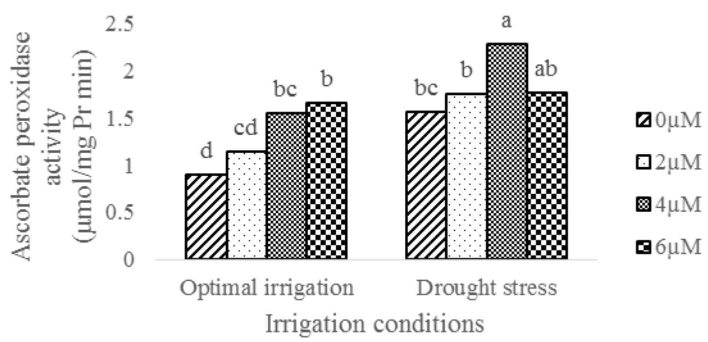


شکل ۳- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر فعالیت گایاکول پراکسیداز

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 3. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the guaiacol peroxidase activity

.Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05



شکل ۴- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 4. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the ascorbate peroxidase activity

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

جدول ۱- تجزیه واریانس پارامترهای فیزیولوژیکی و عملکرد دانه لوبیا با اعمال غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی

Table 1. Analysis of variance of physiological parameters and seed yield in bean by application of different concentrations of Epibrassinolide under optimal irrigation and drought stress conditions

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	میانگین مربعات MS									
		کاتالاز Catalase	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	سوپراکسید دیسمیوتاز Superoxide dismutase	نیترات ردوکتاز Nitrate reductase	محتوای کلروفیل a Chlorophyll a content	محتوای کلروفیل b Chlorophyll b content	محتوای کلروفیل کل Total content of chlorophyll	محتوای کاروتنوئید Carotenoid content	عملکرد دانه Seed yield
تکرار Replication	2	0.00002^{ns}	0.16^{ns}	0.21^{ns}	403066.52^{ns}	0.98^{ns}	0.68^{ns}	0.06^{ns}	1.16^{ns}	0.06^{ns}	384286.77^{ns}
آبیاری Irrigation	1	0.0006**	6.73*	3.38*	1186463.81*	24.91^{ns}	0.07^{ns}	0.0003^{ns}	0.08^{ns}	0.02^{ns}	29224641.05*
خطای اصلی Error1	2	0.000003	0.11	0.17	57423.56	5.88	0.15	0.009	0.21	0.04	522929.00
ژنوتیپ Genotype	1	0.00003^{ns}	2.40**	0.04^{ns}	2438.32^{ns}	0.80^{ns}	0.08^{ns}	0.00009^{ns}	0.08^{ns}	0.004^{ns}	2810849.76**
هورمون Hormone	3	0.0004**	0.62**	1.08**	832400.19**	17.02**	0.46**	0.05**	0.80**	0.09**	1111848.91**
آبیاری× ژنوتیپ Irrigation*Genotype	1	0.00002^{ns}	0.08^{ns}	0.39^{ns}	102164.98^{ns}	0.32^{ns}	1.49**	0.11**	2.42**	0.19**	854880.42*
آبیاری×هورمون Irrigation*Hormone	3	0.00004^{ns}	0.20^{ns}	0.24^{ns}	13462.63^{ns}	2.43^{ns}	0.30*	0.03*	0.49*	0.03^{ns}	103955.50^{ns}
ژنوتیپ×هورمون Genotype*Hormone	3	0.00005^{ns}	0.10^{ns}	0.04^{ns}	126869.39^{ns}	0.62^{ns}	0.16^{ns}	0.02^{ns}	0.28^{ns}	0.04^{ns}	112591.72^{ns}
آبیاری× ژنوتیپ×هورمون Irrigation*Genotype* Hormone	3	0.000008^{ns}	0.07^{ns}	0.08^{ns}	88290.73^{ns}	1.74^{ns}	0.06^{ns}	0.008^{ns}	0.10^{ns}	0.006^{ns}	43080.59^{ns}
خطای کل Error2	28	0.00003	0.09	0.19	126419.05	3.15	0.09	0.009	0.13	0.01	139151.25
ضریب تغییرات (درصد) (%) CV		24.93	24.62	27.72	27.22	25.37	28.07	29.33	26.18	25.15	19.95

ns، * و ** به‌ترتیب نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار، وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

ns, * and ** indicate no significant difference and significant difference at the probability level of 5% and 1%, respectively.

جدول ۲- مقایسات میانگین پارامترهای فیزیولوژیکی و عملکرد دانه لوبیا با اعمال غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی

Table 2. Mean comparisons of physiological parameters and seed yield in bean by application of different concentrations of Epibrassinolide under optimal irrigation and drought stress conditions

نیترات ردوکتاز (میکرومول نیتریت در ساعت به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محلول) **Nitrate reductase (μmol NO_2/mg Pr hr)**	محتوای کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) **Chlorophyll a content (mg/g FW)**	محتوای کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) **Chlorophyll b content (mg/g FW)**	محتوای کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) **Total content of chlorophyll (mg/g FW)**	محتوای کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) **Carotenoid content (mg/g FW)**	عملکرد دانه (کیلوگرم بر هکتار) **Seed yield (kg/h)**
		شرایط آبیاری Irrigation conditions			
7.72a	1.10a	0.321a	1.42a	0.49a	2650.0a
6.28a	1.02a	0.316a	1.33a	0.44a	1089.4b
		ژنوتیپ‌ها Genotypes			
6.87a	1.10a	0.320a	1.42a	0.45a	1627.7b
7.13a	1.02a	0.317a	1.33a	0.47a	2111.7a
		غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید (میکرومولار) Different concentrations of Epibrassinolide (μM)			
5.36b	0.77b	0.23b	1.00b	0.34b	1415.9b
6.88a	1.19a	0.37a	1.56a	0.52a	2068.2a
7.95a	1.17a	0.35a	1.52a	0.50a	2001.7a
7.82a	1.10a	0.32a	1.42a	0.49a	1993.0a

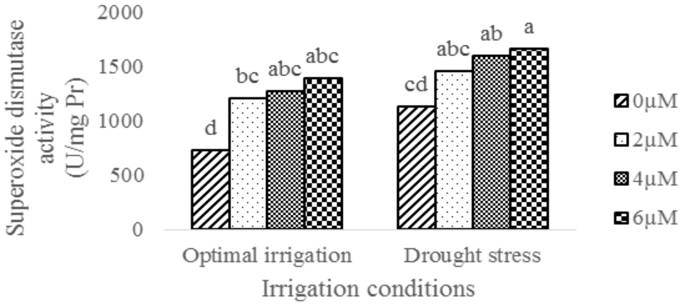
	کاتالاز (میکرومولار در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محلول) **Catalase (μmol/mg Pr min)**	گایاکول پراکسیداز (میکرومولار در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محلول) **Guaiacol peroxidase (μmol/mg Pr min)**	آسکوربات پراکسیداز (میکرومولار در دقیقه در هر میلی‌گرم پروتئین محلول) **Ascorbate peroxidase (μmol/mg Pr min)**	سوپراکسید دیسمیوتاز (واحد آنزیم در مقدار میلی‌گرم پروتئین محلول) **Superoxide dismutase (U/mg Pr)**
		شرایط آبیاری Irrigation conditions		
آبیاری مطلوب Optimal irrigation	0.018b	0.88b	1.31b	1148.79b
تنش خشکی Drought stress	0.025a	1.62a	1.84a	1463.23a
		ژنوتیپ‌ها Genotypes		
COS16	0.022a	1.47a	1.61a	1298.9a
Kusha	0.021a	1.03b	1.55a	1313.1a
		غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید (میکرومولار) Different concentrations of Epibrassinolide (μM)		
0	0.014b	0.92b	1.23c	929.4b
2	0.022a	1.33a	1.45bc	1332.8a
4	0.024a	1.42a	1.91a	1434.2a
6	0.026a	1.34a	1.72ab	1527.6a

میانگین‌های با حروف مشابه بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Mean values sharing similar letter(s) in a parameter, are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at $p\leq0.05$.

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

اثر هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز معنی‌دار بود (جدول ۱). کاربرد اپی‌براسینولید باعث افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز نسبت به عدم کاربرد این هورمون شد و بالاترین فعالیت این آنزیم با کاربرد غلظت ۴میکرومولار اپی‌براسینولید حاصل شد که با کاربرد سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). کاربرد غلظت ۴ میکرومولار اپی‌براسینولید، باعث افزایش ۴۸/۳۲ درصدی در فعالیت نیترات ردوکتاز نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (جدول ۲).



شکل ۵- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر فعالیت سوپراکسید دیسمیوتاز

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

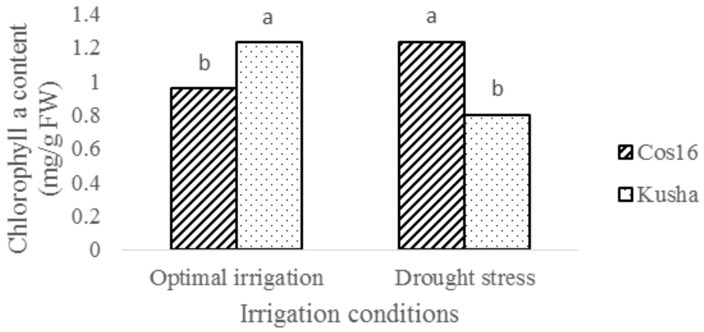
Fig. 5. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the superoxide dismutase activity

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at $p \leq 0.05$.

بهبود در فعالیت نیترات ردوکتاز می‌تواند مربوط به تأثیر براسینواستیروئید به ترجمه و یا رونویسی نیترات ردوکتاز (Bajguz, 2000) و یا جذب نیترات در سطح غشاء (Mai *et al*., 1989) باشد. همچنین به نظر می‌رسد که ممکن است دلیل این افزایش، این باشد که براسینواستروئیدها سیالیت غشای پلاسمایی را که توسط تنش آب تغییر کرده است، حفظ می‌کنند و جذب نیترات را که القاءکننده فعالیت نیترات ردوکتاز است، بهبود می‌بخشند (Talaat & Shawky, 2016). گزارش شده است که کاربرد براسینواستروئید منجر به افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز شد و این افزایش را ناشی از بهبود در تعادل آب برگ و افزایش پتانسیل آب برگ تحت شرایط کمبود آب دانستند (Sairam, 1994). در مطالعه‌ای کاربرد براسینواستروئید (هوموبراسینولید) باعث افزایش در فعالیت نیترات ردوکتاز در هر دو شرایط اعمال تنش خشکی و بدون تنش خشکی شد (Fariduddin *et al*., 2009). محققان گزارش کردند که براسینواستروئیدها از طریق تأثیر بر بیان ژن و یا اثر بر غشاهای سلولی بر بیوسنتز آنزیم‌ها مانند نیترات ردوکتاز تأثیر می‌گذارند (Khripach *et al*., 1999). در پژوهشی دیگر نیز کاربرد براسینواستروئید باعث افزایش در فعالیت نیترات ردوکتاز شده است (Talaat & Shawky, 2016) که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین، در پژوهش‌هایی گزارش شده است که تنش خشکی باعث کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز و کاهش جذب نیترات شده است (Casadebaig *et al*., 2008; Talaat & Shawky, 2016). در پژوهش حاضر، اعمال تنش خشکی باعث کاهش ۱۸/۶۵ درصدی در فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نسبت به آبیاری مطلوب شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲).

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها

اثر هورمون‌پاشی ($p \leq 0.01$)، اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها ($p \leq 0.01$) و اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی ($p \leq 0.05$) بر محتوای کلروفیل a، b و کل معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین اثر هورمون‌پاشی ($p \leq 0.01$) و اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها ($p \leq 0.01$) بر محتوای کاروتنوئیدها نیز معنی‌دار بود (جدول ۱). رقم کوشا در شرایط آبیاری مطلوب و ژنوتیپ COS16 در شرایط تنش خشکی بالاترین محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها را داشتند و نیز رقم کوشا در شرایط تنش خشکی و ژنوتیپ COS16 در شرایط آبیاری مطلوب پایین‌ترین این صفات را به خود اختصاص دادند (شکل‌های ۶ تا ۹). اعمال تنش خشکی در رقم کوشا به‌ترتیب باعث کاهش ۳۴/۹۳، ۲۷/۷۲، ۳۳/۲۷ و ۳۰/۶۵ درصدی و در ژنوتیپ COS16 به‌ترتیب باعث افزایش ۲۸/۷۸، ۳۳/۵۸، ۲۹/۷۶ و ۱۹/۸۵ درصدی در محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها شد (شکل‌های ۶ تا ۹). در شرایط تنش ملایم با کاهش سطح برگ، غلظت کلروفیل در واحد سطح برگ افزایش می‌یابد و به عبارت دیگر، هر چه تلفات آب و انقباض سلول‌ها بیشتر شود، غلظت محلول سلول افزایش می‌یابد، درحالی که تنش شدید باعث توقف کلروفیل‌سازی می‌گردد. در این پژوهش، احتمالاً اعمال تنش خشکی در ژنوتیپ COS16 تنشی ملایم و در رقم کوشا تنشی شدید بوده است. کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش خشکی شدید به دلیل تخریب غشاهای تیلاکوئیدهای کلروپلاست و اکسیداسیون نوری کلروفیل در اثر افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و نیز افزایش فعالیت کلروفیلاز است (Alonso *et al*., 2001). کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها در شرایط تنش خشکی در مطالعات دیگری بر روی لوبیا (Armand *et al*., 2016)، نخود (Hosseinzadeh *et al*., 2015) و سویا (Zhang *et al*., 2008) نیز گزارش شده است.

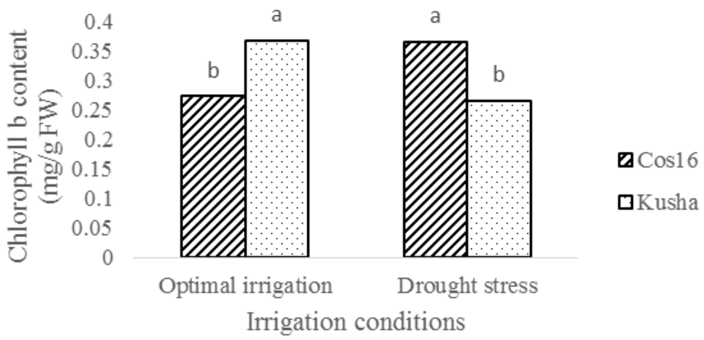


شکل ۶- اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها بر محتوای کلروفیل a

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 6. Interaction between irrigation conditions and genotypes on the chlorophyll a content

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

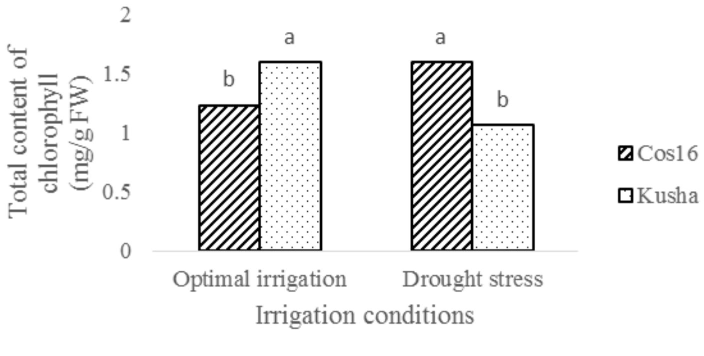


شکل ۷- اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها بر محتوای کلروفیل b

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 7. Interaction between irrigation conditions and genotypes on the chlorophyll b content

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

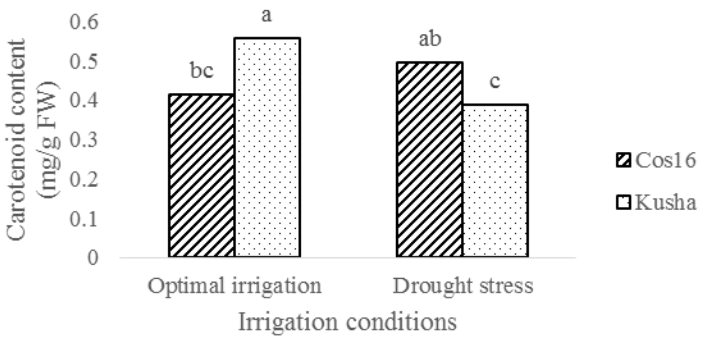


شکل ۸- اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها بر محتوای کلروفیل کل

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 8. Interaction between irrigation conditions and genotypes on the total content of chlorophyll

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.



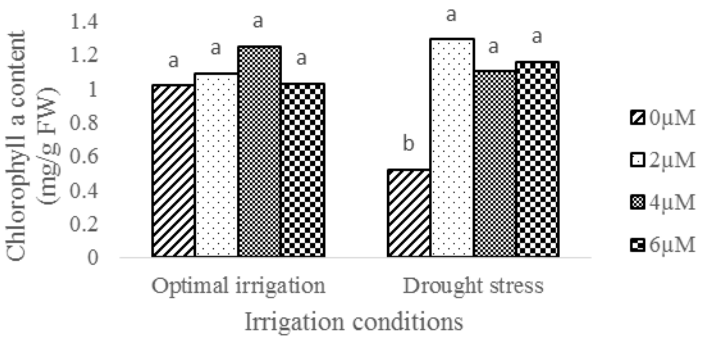
شکل ۹- اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها بر محتوای کاروتنوئید

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 9. Interaction between irrigation conditions and genotypes on the carotenoid content

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

نتـایج مقایسـات میـانگین اثـر متقابـل شـرایط آبیـاری و هورمون‌پاشی نیـز نشـان داد کـه در شـرایط آبیـاری مطلـوب، کاربرد غلظت‌های مختلف اپی‌براسینولید باعـث افـزایش انـدکی در محتـــوای کلروفیـــل a، b و کـــل شـــد و کـــاربرد غلظـــت ۴میکرومولار از این هورمون باعث بیشـترین مقـدار افـزایش در صفات فوق نسبت به عدم کاربرد هورمون شد (شکل‌های ۱۰ تا ۱۲). درحالی‌که در شرایط اعمال تـنش خشـکی، ایـن افـزایش معنی‌دار بود و کاربرد غلظت ۲میکرومولار از این هورمون باعـث حصول بالاترین مقدار افزایش در صفات فـوق نسـبت بـه عـدم کاربرد هورمون گردید (شکل‌های ۱۰ تا ۱۲). به عبـارت دیگـر، کاربرد اپی‌براسینولید در شرایط تـنش خشـکی باعـث افـزایش بیشتری در محتـوای کلروفیـل a، b و کـل نسـبت بـه شـرایط آبیاری مطلوب شد. اثربخشی بیشتر کاربرد براسینواستروئید در شرایط نامساعد نسبت به شرایط مطلوب محیطـی در مطالعـات دیگری نیز گزارش شده است (Vardhini & Anjum, 2015; Talaat & Shawky, 2016). همچنین، کاربرد اپی‌براسینولید باعث افزایش محتوای کاروتنوئیدها نسبت به عـدم کـاربرد ایـن هورمون شد و بالاترین این صفت با کاربرد غلظت ۲ میکرومولار اپی‌براسینولید حاصل شد که با کاربرد سـایر غلظـت‌هـا تفـاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲). کاربرد غلظـت ۲ میکرومـولار اپـی‌براسـینولید، باعـث افـزایش ۵۲/۹۴ درصـدی در محتـوای کاروتنوئیدها نسبت به عـدم کـاربرد هورمـون شـد (جـدول ۲). افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها در گیاهان تیمارشده با براسینواستروئید در مطالعات دیگـری نیـز گـزارش شـده اسـت (Zhang *et al*., 2008; Fariduddin *et al*., 2009; Anjum *et al*., 2011; Thussagunpanit *et a*l., 2015; Asghari & Zahedipour, 2016) که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد.

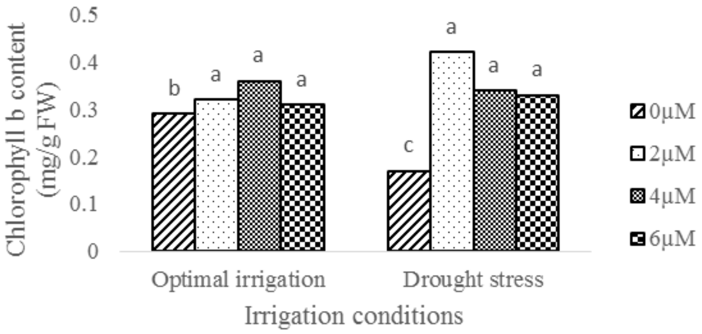


شکل ۱۰- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر محتوای کلروفیل a

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 10. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the chlorophyll a content

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at p≤0.05.

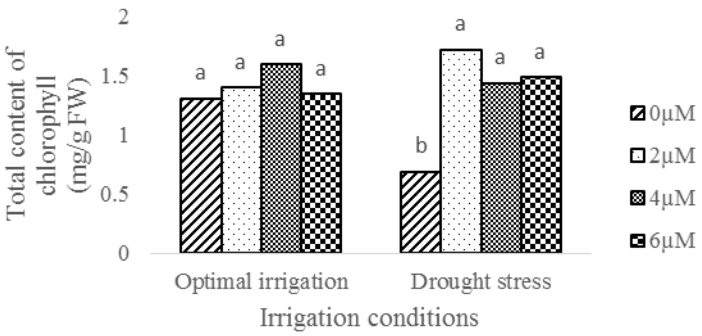


شکل ۱۱- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر محتوای کلروفیل b

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 11. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the chlorophyll b content

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at $p\leq0.05$.



شکل ۱۲- اثر متقابل شرایط آبیاری و هورمون‌پاشی بر محتوای کلروفیل کل

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 12. Interaction between irrigation conditions and hormone spraying on the total content of chlorophyll

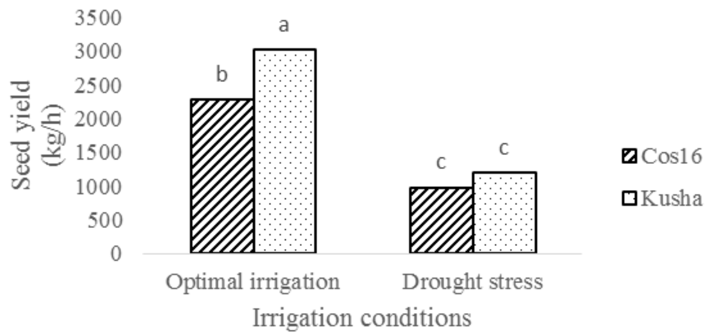
Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at $p\leq0.05$.

عملکرد دانه

اثر شرایط آبیاری ($p\leq0.05$)، ژنوتیپ‌ها ($p\leq0.01$)، هورمون‌پاشی ($p\leq0.01$) و اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها ($p\leq0.05$) بر عملکرد دانه معنی‌دار بود (جدول ۱). رقم کوشا در شرایط آبیاری مطلوب (با میانگین ۳۰۲۵/۴۵ کیلوگرم بر هکتار) بالاترین عملکرد دانه و ژنوتیپ COS16 در شرایط اعمال تنش خشکی (با میانگین ۹۸۰/۸۹ کیلوگرم بر هکتار) پایین‌ترین عملکرد دانه را داشتند (شکل ۱۳). اعمال تنش خشکی در رقم کوشا باعث کاهش ۶۰/۴۰ درصدی و در ژنوتیپ COS16 باعث کاهش ۵۶/۸۸ درصدی در عملکرد دانه شد (شکل ۱۳). تنش خشکی از طریق کاهش آب برگ و بسته‌شدن روزنه‌ها، کاهش سطح برگ و اختلال در روند جذب و انتقال عناصر غذایی و نیز کاهش غلظت کلروفیل، باعث کاهش تولید مواد فتوسنتری در گیاه شده و در نهایت منجر به افت عملکرد دانه شده است. نتایج تحقیقات سایر آزمایش‌ها نیز حاکی از کاهش عملکرد دانه لوبیا بر اثر تنش خشکی است (Munoz-Perea *et al*., 2006; Ahmed & Suliman, 2010; Bastos I., 2011). در پژوهشی دیگر نیز تنش خشکی باعث کاهش عملکرد دانه لوبیا شد و محققان این کاهش را به دلیل کاهش گره‌زایی ریشه‌ها در شرایط تنش خشکی دانستند (Upreti & Murti, 2004).

کاربرد اپی‌براسینولید باعث افزایش عملکرد دانه نسبت به عدم کاربرد این هورمون شد (جدول ۲). بالاترین عملکرد دانه با کاربرد غلظت ۲ میکرومولار اپی‌براسینولید (با میانگین ۲۰۶۸/۲ کیلوگرم بر هکتار) حاصل شد، به‌طوری‌که کاربرد این غلظت، عملکرد دانه را به میزان ۴۶/۰۷ درصد نسبت به عدم کاربرد هورمون افزایش داد (جدول ۲). در مطالعه‌ای کاربرد براسینولید باعث افزایش عملکرد دانه لوبیا در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی شد و محققان این افزایش را به دلیل تأثیر مثبت براسینولید بر محتوای سایتوکینین و فعالیت

نیتروژناز در ریشه‌ها دانستند (Upreti & Murti, 2004). افزایش عملکرد دانه با کاربرد براسینولید ممکن است به‌دلیل راندمان فتوشیمیایی بالاتر از نظر جذب دی‌اکسیدکربن باشد که به افزایش تجمع رنگدانه‌های فتوسنتزی به ویژه کلروفیل و محتوای بیشتر پروتئین‌های محلول نسبت داده می‌شود (Bera *et al*., 2014). محلول‌پاشی با براسینولید موجب افزایش عملکرد دانه ماش (Sengupta *et al*., 2009)، سویا (Zhang *et al*., 2008)، آفتابگردان (Bera *et al*., 2014) و ذرت (Anjum *et al*., 2011) نیز شده است که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد.



شکل ۱۳- اثر متقابل شرایط آبیاری و ژنوتیپ‌ها بر عملکرد دانه

میانگین‌های با حروف مشابه مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 13. Interaction between irrigation conditions and genotypes on the seed yield

Mean values sharing similar letter(s) are not significantly different according to Duncan's multiple range tests at $p \leq 0.05$.

نتیجه‌گیری

اعمال تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسمیوتاز شد. با توجه به اهمیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاکسازی رادیکال سوپراکسید و هیدروژن پراکسید و جلوگیری از تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب، به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث می‌گردد که اثرات منفی تنش اکسنده ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن کمتر صورت بگیرد و در نتیجه مقاومت به تنش خشکی حاصل شود. کاربرد اپی‌براسینولید با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نیترات ردوکتاز و محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها باعث افزایش عملکرد دانه و نیز افزایش مقاومت به تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ لوبیا مورد مطالعه شد، ضمن این‌که دستیابی به اطلاعاتی جامع در زمینه تأثیرات مثبت اپی براسینولید نیازمند مطالعه این هورمون در شرایط مختلف آب و هوایی نیز می‌باشد. در بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه نیز، از آنجا که بیشترین عملکرد دانه مربوط به رقم کوشا در شرایط آبیاری مطلوب و کمترین افت عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی مربوط به ژنوتیپ COS16 بود، می‌توان رقم کوشا را در شرایط آبیاری مطلوب و ژنوتیپ COS16 را در شرایط احتمال وجود تنش خشکی پیشنهاد نمود.

منابع

1. Abedi, T., and Pakniyat, H. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46(1): 27-34.
2. Ahammed, G.J., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K., and Yu, J.Q. 2013. Brassinosteroid regulates secondary metabolism in tomato towards enhanced tolerance to phenanthrene. Biologia Plantarum 57(1): 154-158.
3. Ahmadizadeh, M., Valizadeh, M., Zaefizadeh, M., and Shahbazi, H. 2011. Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. Journal of Applied Sciences Research 7(3): 236-246.
4. Ahmed, F.E., and Suliman, A.S.H. 2010. Effect of water stress applied at different stages of growth on seed yield and water use efficiency of cowpea. Agriculture and Biology Journal of North America 1(4): 534-540.

5. AL-Ghamdi, A.A. 2009. Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. International Journal of Agriculture and Biology 11: 7-12.
6. Ali, B., Hasan, S.A., and Hayat, S. 2008. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Environmental and Experimental Botany 62(2): 153-159.
7. Alonso, R., Elvira, S., Castillo, F.J., and Gimeno, B.S. 2001. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. Plant Cell and Environment 24(4): 905-916.
8. Amjad, H., Noreen, B., Javed, A., and Nayyer, I. 2011. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. Plant Physiology and Biochemistry 49(2): 178-185.
9. Anjum, S.A., Wang, L.C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L.L., and Zou, C.M. 2011. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. Journal of Agronomy and Crop Science 197(3): 177-185.
10. Armand, N., Amiri, H., and Ismaili, A. 2016. Interaction of methanol spray and water-deficit stress on photosynthesis and biochemical characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadry. Photochemistry and Photobiology 92: 102-110.
11. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24(1): 1-15.
12. Arora, P., Bhardwaj, R., and Kanwar, M.K. 2010. 24-epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. under Zn metal stress. Physiology and Molecular Biology of Plants 16(3): 285-293.
13. Asghari, M., and Zahedipour, P. 2016. 24-Epibrassinolide acts as a growth-promoting and resistance-mediating factor in strawberry plants. Journal of Plant Growth Regulation 35(3): 722-729.
14. Bajguz, A. 2000. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cell of *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 38(3):209-215.
15. Bajguz, A., and Hayat, S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiology and Biochemistry 47(1):1-8.
16. Bastos, E.A., Nascimento, S.P., Silva, E.M., Filho, F.R.F., and Gomide, R.L. 2011. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. Revista Ciencia Agronomica 42(1): 100-107.
17. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44(1): 276-287.
18. Behnamnia, M., Kalantari, Kh.M., and Rezanejad, F. 2009. Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. General and Applied Plant Physiology 35(1-2): 22-34.
19. Bera, A.K., Pramanik, K., and Mandal, B. 2014. Response of biofertilizers and homobrassinolide on growth, yield and oil content of sunflower (*Helianthus annuus* L.). African Journal of Agricultural Research 9(48): 3494-3503.
20. Bhardwaj, R., Arora, N., Sharma, P., and Arora, H.K. 2007. Effects of 28-homobrassinolide on seedling growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities under nickel stress in seedlings of *Zea mays* L. Asian Journal of Plant Sciences 6(5): 765-772.
21. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.
22. Casadebaig, P., Debaeke, P., and Lecoeur, J. 2008. Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. European Journal of Agronomy 28(4): 646-654.
23. Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidase. Methods Enzymol 2: 764-775.
24. Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M.L., Zuily-Fodil, Y., and Cruz de Carvalho, M.H. 2010. An aspartic acid protease from common bean is expressed 'on call' during water stress and early recovery. Journal of Plant Physiology 167(18): 1606-1612.
25. Ding, H.D., Zhu, X.H., Zhu, Z.W., Yang, S.J., Zha, D.S., and Wu, X.X. 2012. Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 24-epibrassinolide. Biologia Plantarum 56(4): 767-770.
26. Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S., and Ahmad, A. 2009. Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. Acta Physiologiae Plantarum 31(5): 889-897.
27. Gaber, M.A. 2010. Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. Plant Signaling & Behavior 5(4): 369-374.

28. Gupta, K.J., Stoimenova, M., and Kaiser, W.M. 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. Journal of Experimental Botany 56: 2601-2609.
29. Habibi, G. 2013. Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. Acta Agriculturae Slovenica 101(1): 31-39.
30. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., and Fujita, M. 2012. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. Australian Journal of Crop Science 6(8): 1314-1323.
31. Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.A.M., Karimi, M., and Ghanati, F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta Physiologia Plantarum 33(1): 105-112.
32. Hosseinzadeh, S.R., Amiri, H., and Ismaili, A. 2015. Effect of vermincompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Photosynthetica 54(1): 87-92.
33. Jiang, M., and Zhang, J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant and Cell Physiology 42(11): 1265-1273.
34. Kang, Y.Y., and Guo, S.R. 2011. Role of brassinosteroids on horticultural crops. In: S. Hayat and A. Ahmad (Eds). Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. Springer, Dordrech, pp 269-288.
35. Kartal, G., Temel, A., Arican, E., and Gozukirmizi, N. 2009. Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. Plant Growth Regulation 58(3): 261-267.
36. Khan, M.H., and Panda, S.K. 2008. Alternations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. Acta Physiologia Plantarum 30: 81-89.
37. Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., and De Groot, A.E. 1999. Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. Academic Press, San Diego.
38. Kosova, K., Vítamvas, P., Urban, M.O., and Prasil, I.T. 2013. Plant proteome responses to salinity stress-comparison of glycophytes and halophytes. Functional Plant Biology 40(9): 775-786.
39. Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., and Mittler, R. 2008. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. Journal of Biological Chemistry 283: 34197-34203.
40. Li, Y.H., Liu, Y.J., Xu, X.L., Jin, M., An, L.Z., and Zhang, H. 2012. Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. Biologia Plantarum 56(1): 192-196.
41. Liu, H.C., Tian, D.Q., Liu, J.X., Ma, G.Y., Zou, Q.C., and Zhu, Z.J. 2013. Cloning and functional analysis of a novel ascorbate peroxidase (APX) gene from *Anthurium andraeanum*. Journal of Zhejiang University Science 14(12): 1110-1120.
42. Mackintosh, C., Douglas, P., and Lillo, C. 1995. Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. Plant Physiology 107: 451-457.
43. Mai, Y.Y., Lin, J.M., Zeng, X.L., and Pan, R.J. 1989. Effect of homobrassinolide on the activity of nitrate reductase in rice seedlings. Plant Physiol Commun 2: 50-52.
44. Malik, A.A., Li, W.G., Lou, L.N., Weng, J.H., and Chen, J.F. 2010. Biochemical/physiological characterization and evaluation of in vitro salt tolerance in cucumber. African Journal of Biotechnology 9(22): 3284-3292.
45. Mishra, A., and Jha, B. 2011. Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. Botanica Marina 54(2): 195-199.
46. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7(9): 405-410.
47. Munoz-Perea, C.G., Teran, H., Allen, R.G., Wright, J.L., Westermann, D.T., and Singh, S.P. 2006. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. Crop Science 46: 2111-2120.
48. Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22(5): 867-880.
49. Nazari, M., Maali Amiri, R., Mehraban, F.H., and Khaneghah, H.Z. 2012. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. Russian Journal of Plant Physiology 59(2): 183-189.
50. Sairam, R.K. 1994. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. Plant Growth Regulation 14: 173-181.
51. Sengupta, K., Mitra, S., and Ray, M. 2009. Effect of brassinolide on growth and yield of summer greengram crop. Indian Agriculturist 53(3/4): 155-157.

52. Sharma, P., Bhardwaj, R., Arora, N., and Arora, H.K. 2007. Effect of 28-homobrassinolide on growth, zinc metal uptake and antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. seedlings. Brazilian Journal of Plant Physiology 19(3): 203-210.
53. Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 14: 1-26.
54. Singh-Gill, S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48(12): 909-930.
55. Sirhindi, G., Kumar, S., Bhardwaj, R., and Kumar, M. 2009. Effects of 24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide on the growth and antioxidant enzyme activities in the seedlings of *Brassica juncea* L. Physiology and Molecular Biology of Plants 15(4): 335-341.
56. Talaat, N.B., and Shawky, B.T. 2012. 24-Epibrassinolide ameliorates the saline stress and improves the productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). Environmental and Experimental Botany 82: 80-88.
57. Talaat, N.B., Shawky, B.T., and Ibrahim, A.S. 2015. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. Environmental and Experimental Botany 113: 47-58.
58. Talaat, N.B., and Shawky, B.T. 2016. Dual application of 24-Epibrassinolide and Spermine confers drought stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) by modulating polyamine and protein metabolism. Journal of Plant Growth Regulation 35(2): 518-533.
59. Thussagunpanit, J., Jutamanee, K., Sonjaroon, W., Kaveeta, L., Chai-Arree, W., Pankean, P., and Suksamrarn, A. 2015. Effects of brassinosteroid and brassinosteroid mimic on photosynthetic efficiency and rice yield under heat stress. Photosynthetica 53(2): 312-320.
60. Upreti, K.K., and Murti, G.S.R. 2004. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in French bean under water stress. Biologia Plantarum 48(3): 407-411.
61. Vardhini, B.V., and Anjum, N.A. 2015. Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. Frontiers in Environmental Science DOI: 10.3389/fenvs.2014.00067.
62. Verma, A., Malik, C.P., and Gupta, V.K. 2012. In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut. International Scholarly Research Network Doi:10.5402/2012/356485.
63. Wang, C., Yang, C.P., and Wang, Y.C. 2009. Cloning and expression analysis of an APX gene from *Betula platyphylla*. Journal of Northeast Forestry University 37(3): 79-81.
64. Xu, P.L., Guo, Y.K., Bai, J.G., Shang, L., and Wang, X.J. 2008. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. Physiologia Plantarum 132(4): 467-478.
65. Yong, Z., Hao-Ru, T., and Ya, L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences 4: 456-462.
66. Yuan, G.F., Jia, C.G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L.P., Liu, N., and Wang, Q.M. 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. Scientia Horticulturae 126(2): 103-108.
67. Zeid, I.M., and Shedeed, Z.A. 2006. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. Biologia Plantarum 50(4): 635-640.
68. Zhang, M., Zhai, Z., Tian, X., Duan, L., and Li, Z. 2008. Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean (*Glycine max* L.). Plant Growth Regulation 56(3): 257-264.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 2, 2020, p. 76-94 (Research Article)

Study the effect of Epibrassinolide application on the activity of some antioxidant enzymes, nitrate reductase, and photosynthetic pigments of common bean under drought stress

Mohammadi[1*], M., Pouryousef[2], M., Tavakoli[2], A. & Mohseni Fard[3], E.

1. PhD. Student in Plant Physiology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran (pouryousef@znu.ac.ir & tavakoli@znu.ac.ir, respectively)
3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran; mohsenifard.ehsan@znu.ac.ir

Received: 21 October 2018
Accepted: 3 March 2019

DOI: 10.22067/ijpr.v11i2.76131

Introduction

Drought is one of the most important environmental stresses and is one of the most common causes of plant growth retardation and yields, and usually decreases the productivity of plants along with other environmental stresses, including salinity and heat. One of the reasons that environmental stresses such as drought, reduces growth and plant photosynthesis ability, is a disturbance in the balance between the production of free oxygen radicals and the protective mechanisms that remedy these radicals which results in the accumulation of reactive oxygen species (ROS), induction of oxidative stress, damage to proteins, membrane lipids, and other cellular components. Under adverse environmental conditions, the role of antioxidant defense system in protecting cellular membranes and other growing organs against oxidative damage seems to be very important. Brassinosteroids (BRs) comprise a group of steroidal hormones that have been implicated in a wide range of physiological responses in plants, including stem elongation, growth of pollen tubes, ethylene biosynthesis, proton pump activation, the regulation of gene expression, activation of enzymes, response to different stresses, nucleic acid and protein synthesis, and photosynthesis. In addition, BRs can protect against damage from stresses such as drought, salinity, and high temperature by activating various mechanisms in plants and increasing the activity of enzymatic antioxidants such as catalase, superoxide dismutase, peroxidase, and glutathione reductase. The purpose of this study was to investigate the possibility of increasing the activity of some antioxidant enzymes, nitrate reductase, photosynthetic pigments, and finally, the seed yield of common beans with the use of Epibrassinolide under drought stress conditions.

Materials & Methods

A split factorial experiment was conducted based on randomized complete block design with three replications at the research farm of Faculty of Agriculture, the University of Zanjan during the 2016-2017 cropping season. In this experiment, two irrigation conditions included optimal irrigation and drought stress were applied to main plots and two common bean genotypes including Kusha cultivar and COS16 genotype, and four levels of brassinosteroid including of no-application (control), two, four, and six μM were allocated to subplots as factorial. Drought stress was applied at the flowering stage, and common bean plants were sprayed with brassinosteroid (Epibrassinolide) simultaneously with drought stress. In this study, the activity of catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase, nitrate reductase, chlorophyll and carotenoid contents, and seed yield were studied.

Results & Discussion

The results showed that drought stress increased the activity of catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase by 38.89%, 84.09%, 40.46%, and 27.37% in contrast with the optimal

***Corresponding Author:** mohammadi.mahsa@znu.ac.ir

irrigation, respectively. The highest activity of catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase were obtained using different concentrations of Epibrassinolide under drought stress conditions. The application of 2, 4, and 6 μM of Epibrassinolide in drought stress conditions increased by 73.33%, 86.67%, and 113.33% in the catalase activity, increased by 56.36%, 71.82%, and 62.73% in the guaiacol peroxidase activity, increased by 12.82%, 46.15%, and 13.46% in the ascorbate peroxidase activity, and increased by 29.15%, 41.49%, and 47.11% in the superoxide dismutase activity in comparison with non-application of this hormone. It has been reported that the use of BRs significantly improves plant drought tolerance and reduces the accumulation of reactive oxygen species by increasing the activity of antioxidant enzymes. It has been reported that the application of BRs increased the antioxidant enzymes activity in maize, tomato, mustard, soybean, and barley. Also, nitrate reductase activity increased by using of Epibrassinolide, which can enhance plant tolerance to environmental stress. The highest activity of nitrate reductase was obtained by application of 4 μM of Epibrassinolide, which did not show any significant difference with other concentrations. Improvement in the activity of nitrate reductase can be attributed to the effect of BRs on translation or transcription of nitrate reductase, or nitrate absorption at the membrane surface. In optimal irrigation conditions, the use of different concentrations of Epibrassinolide has a slight increase in the contents of chlorophyll a, b, and total, and the use of 4 μM of this hormone resulted in the highest increase in the above traits compared to non-application of the hormone. However, under drought stress conditions, this increase was significant, and the use of 2 μM of this hormone resulted in the highest increase in the above traits compared to non-application of the hormone. In other words, the use of Epibrassinolide in drought stress conditions caused a higher increase in chlorophyll a, b, and total contents relative to optimal irrigation conditions. Application of Epibrassinolide increased the seed yield in both common bean genotypes by increasing the activity of antioxidant enzymes, nitrate reductase, and chlorophyll and carotenoid contents. The highest seed yield was obtained by application of 2 μM of Epibrassinolide with an average of 2068.2 kg/ha. Among the studied genotypes, the Kusha cultivar in optimal irrigation conditions (with an average of 3025.45 kg/ha) had the highest seed yield and the COS16 genotype in drought stress conditions (with an average of 980.89 kg/ha) had the lowest seed yield.

Conclusion

In general, the use of Epibrassinolide can be suggested as a solution to increase drought stress tolerance and enhance the growth and seed yield of common beans under optimal irrigation and drought stress conditions. In addition, the achievement of comprehensive information on the positive effects of Epibrassinolide requires a study of this hormone in different weather conditions and with other different bean genotypes.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Chlorophyll and carotenoid contents, Irrigation, Seed yield, Superoxide dismutase